

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-124771

(43)Date of publication of application : 11.05.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 11-308028

(71)Applicant : NIPPON GENE CO LTD

(22)Date of filing : 29.10.1999

(72)Inventor : YONEDA SUKEYASU

ITOOKA TOSHIYUKI

OGAMI MITSUAKI

NAKAGAWA KAORU

## (54) DETECTOR BY IMMUNOCHROMATOGRAPHY

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect even an object to be analyzed not suitable for a sandwich technique by an immunochromatography and to accurately decide the object.

SOLUTION: A specimen applying site 2 applied by a liquid-like specimen, a labeled specific connective substance-containing site 3 containing a labeled specific connective substance and a detecting site 4 for detecting the substance are formed of porous carriers, and sequentially aligned from an upstream side to a downstream side. The labeled specific connective substance movable to the site 4 in a wet state and connected to an object to be analyzed of a predetermined amount is contained in the site 3. An object to be analyzed or a chemically modified article 5 of the object is immobilized to the site 4.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.10.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 30.07.2002

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] While the specimen application site where a liquefied specimen is applied, the indicator unique cementing material content part containing an indicator unique cementing material, and the detecting element which detects an indicator unique cementing material are formed by the porosity carrier It is arranged in order toward the downstream from the upstream. In said indicator unique cementing material content part Detection equipment by the immunity chromatography which constant-rate content of the labeled unique cementing material which it is movable at least to said detecting element in a damp or wet condition, and is combined with an analysis object is carried out, and is characterized by the chemical modification object of an analysis object or an analysis object being fixed by said detecting element.

[Claim 2] Detection equipment by the immunity chromatography according to claim 1 characterized by a part of part of the upstream which can be set at least to said specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element having lapped on [ some ] the part of the downstream.

[Claim 3] Detection equipment by the immunity chromatography according to claim 1 or 2 characterized by forming at least said specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element in band-like, and joining them on pasteboard.

[Claim 4] Detection equipment by the immunity chromatography according to claim 1 to 3 characterized by for said analysis object being hapten and the chemical modification object of said analysis object being a connective of hapten and carrier protein.

---

[Translation done.]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the detection equipment which detects an analysis object with an immunity chromatography method. Of course, the combination of the analysis object and unique cementing material in which especially this invention has a possible sandwich technique is related with the detection equipment which can detect an analysis object also in the combination of an analysis object and a unique cementing material difficult [ a sandwich technique ] or impossible.

[0002]

[Description of the Prior Art] The immunochemistry-measuring method is used widely by detection of the minute amount matter contained in biological materials, such as blood and urine, the microorganism which exists in an environment, or the minute amount matter from the height of the sensibility and singularity. The so-called immunity chromatography method which applied the chromatography to the immunochemistry-measuring method among this measuring method Compared with other immunochemistry-measuring methods, actuation is easy, and the time amount which assay takes is also short. Since a special device is not needed for a judgment and skill is not required, it is widely used for the qualification test in a current scene, for example, the clinical laboratory test in a hospital, many, a laboratory, etc., the qualification test in an environmental inspection site, the qualification test of the pregnancy reaction in a home, etc.

[0003] In detection of the analysis object in the most general immunity chromatography method, make an analysis object and the unique cementing material which attached the various indicators to an analysis object react on chromatography material, the complex (for example, antigen-antibody complex) of an analysis object and an indicator unique cementing material is made to generate, and detecting the indicator of the complex with various means is performed.

[0004] As an indicator used for this approach, there are radioisotope, coloring matter, a fluorescent material, coloring matter, an enzyme, etc., and it is carried out by a radiation detector, a spectrophotometer, or viewing as detection \*\*\*\*. Since the special device for detecting an indicator is not needed, it is not necessary to perform a reaction except the antigen-antibody reaction for making an indicator easy to detect and a judgment does not take skill in judging a detection result, either, an indicator is performed using the coloring matter and judging visually is used widely. As coloring matter, a metal sol, a color sol, a coloring latex, etc. are used. Moreover, since, as for a detection result, B/F separation is performed by the chromatography, viewing on chromatography material will be in a possible coloring condition more clearly.

[0005] The so-called sandwich technique to which complex combines at least a detecting element upwards with the gestalt which puts an analysis object between an indicator unique cementing material and the fixed unique \*\*\*\* matter is used widely by fixing the unique cementing material to an analysis object on chromatography material beforehand as an approach of giving the coloring in which this viewing is possible, and making the complex of an analysis object and an indicator unique cementing material, and the fixed unique cementing material to an analysis object react.

[0006] In a sandwich technique, it is required to use the matter with a binding site (epitope) which is different to an analysis object about the indicator unique cementing material to be used and the fixed unique cementing material, i.e., two kinds of unique cementing materials, in order to make the coloring which it can be efficient and can be viewed perform, and it is needed that it is the matter with an epitope which is different also about an analysis object.

[0007] In addition, although, as for \*\*\*\* which can give two or more epitopes with the same analysis object as an

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



exception, only one sort of unique cementing materials can apply a sandwich technique, compared with the case where the combination of the analysis object which gives a different epitope from two kinds of unique cementing materials in this case is used, the coloring effectiveness in a sandwich technique serves as bad combination. However, depending on the form of the analysis object itself, or the location of an epitope, a three-dimensional failure occurs also as combination \*\*\*\*\* [ object / the selected unique cementing material and the selected analysis object ] in a sandwich technique, and when a sandwich technique is difficult or impossible, a satisfying detection result is not obtained. Therefore, a sandwich technique is unsuitable when detecting low-molecular-weight matter, such as hapten instead of an approach efficiently applicable to the combination of all analysis objects and unique cementing materials, as an analysis object.

[0008] Moreover, in a sandwich technique, in case the complex of an analysis object and an indicator unique cementing material is formed, when a superfluous analysis object exists, the rate of the analysis object of the isolation which does not form the complex of an analysis object and an indicator unique cementing material increases. For this reason, the rate of formation of the complex of a sandwiches mold falls, and the phenomenon whose coloring obtained as a result decreases, and the so-called prozone phenomenon occur against there being many analysis objects.

[0009] As an approach of giving the coloring in which other viewing is possible, the approach the immunity chromatography by the competing method detects estradiol is indicated by JP,7-46107,B. In the immunity chromatography method by this competing method, the chemical modification object of the analysis object itself and an analysis object is used for an indicator unique cementing material, and sandwich techniques differ greatly.

[0010] As for the immunity chromatography by the competing method, the indicator of the chemical modification object of an analysis object or an analysis object is carried out. The analysis object and indicator analysis object in a specimen form the mixed state on chromatography material. Even the detecting element which has fixed the unique cementing material to an analysis object beforehand on chromatography material at this mixed state moves with a chromatography, and mixture reacts to a fixed unique cementing material and a contention target. It is the approach of giving the coloring which can view the complex of an indicator analysis object and the fixed unique \*\*\*\* matter.

[0011] Since the coloring which can be viewed only with the complex of an indicator analysis object and a fixed unique cementing material is given by this competing method, when it is the combination of the unique cementing material in which a sandwich technique is possible, and an analysis object, of course, it is an usable approach also in the combination of one sort of unique cementing materials, and the analysis object which can give only one epitope, therefore it is possible to use it, also when low-molecular-weight matter, such as hapten, is used as an analysis object.

[0012] When using low-molecular-weight matter, such as hapten, as an analysis object, many chemical modification objects of an analysis object are used for the indicator analysis object. This is for raising the reaction effectiveness of that it may be difficult to carry out the direct indicator of the low-molecular-weight matter, such as hapten, and an indicator unique cementing material and a fixed unique cementing material. The method of combining two or more analysis objects with protein support, such as BSA (bovine serum albumin), as a chemical modification method of an analysis object is used widely.

[0013] The connective of estradiol and BSA is prepared in JP,7-46107,B, and the immunity chromatography method by the method of performing the indicator of a color sol to the connective and the competing method which used them is indicated. In the immunity chromatography method by this competing method, a judgment result is given not depending on the amount of the reaction object in a specimen itself but depending on the mixing ratio of an analysis object and an indicator analysis object. Therefore, in order to obtain a stable measurement result, it is required to form the mixed state with an analysis object and an indicator analysis object uniform on chromatography material, and when forming the uneven mixed state partially on chromatography material, or when a difference arises in the mixed state for every measurement, a stable measurement result is not obtained. Furthermore, in the case of low-molecular matter, such as hapten, the difference in the physical property of an analysis object and an indicator analysis object becomes [ the analysis object in a specimen ] large, a difference arises at the rate which moves by it in a chromatography material top, and the uniform mixed state becomes that it is hard to be obtained.

[0014] Moreover, as many analysis objects which are low-molecular matter, such as hapten, exist in a specimen, the inclination of the excess of an analysis object becomes larger according to the difference of the passing speed on chromatography material by the tip side of the developing solution of the mixed liquor of an analysis object and an indicator analysis object. Compared with the case where this forms the uniform mixed state, the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

condition, i.e., the prozone phenomenon—condition in a sandwich technique, that reduction of coloring by many analysis objects combining with a fixed unique cementing material beforehand takes place occurs, and the measuring range of an analysis object becomes narrow.

[0015] From the above thing, it has come to adopt an immunity chromatography method in detection of low-molecular-weight matter, such as hapten. For example, not an immunity chromatography but the immunity agglutination inhibition in slide plate superiors is used for detection of the estriol which used the specimen as urine.

[0016] In the immunity agglutination inhibition of the estriol in urine, at least two sorts of reagents are needed. As a reagent 1, the anti-estriol antibody by which the indicator was carried out is the reagent currently distributed in a liquid. As an indicator, gold colloid, a latex, an erythrocyte, etc. are used and combining these indicators and antibodies is performed by the conventional method. As a reagent 2, like a reagent 1, the support which estriol combined may be good, for example, protein molecules, such as BSA, are [ but ] it may be the reagent currently distributed in a liquid and sufficient as it as support. Association to BSA of the latter estriol can be carried out by the approach indicated by various reference.

[0017] Mix a reagent 1 and a specimen first and it is made to fully react, and next, it adds and a reagent 2 is made to react in the immunity agglutination inhibition of the estriol in urine. When the estriol more than a constant rate exists in a specimen at this time, and the estriol in a reagent 1 and urine has joined together, the antigen-antibody reaction of a reagent 1 and a reagent 2 is checked, and a reagent 1 and a reagent 2 do not generate the aggregate by the antigen-antibody reaction. On the other hand, since there is little association of the estriol in a reagent 1 and urine and the antigen-antibody reaction of a reagent 1 and a reagent 2 is not checked when the estriol in a specimen is below a constant rate, the aggregate by the antigen-antibody reaction of a reagent 1 and a reagent 2 generates.

[0018] By performing the reaction of a reagent 1 and a specimen in this way, and then performing a reaction with a reagent 2, it is used for the immunity agglutination inhibition on a slide plate that the estriol in a specimen checks the agglutination reaction of a reagent 1 and a reagent 2, and it detects estriol according to the existence of the aggregate to produce, or the condition of an aggregate. In this case, when carrying out the half-quantum of the estriol in a specimen, a specimen can be diluted for several sorts of scale factors, inspection same about each diluted specimen can be conducted, and the half-quantum of the estriol in a specimen can be carried out to the dilution scale factor of a specimen by the existence of an aggregate.

[0019] However, at Japanese \*\*\*\*\* of the measurement result by the existence of such an aggregate, or the condition of an aggregate, the difficult and exact judgment has taken skill to judging correctly also by the engineer with abundant experience according to the condition of the obtained aggregate. Moreover, since several steps need dilution of the specimen for a half-quantum, and to be reagent addition operated, actuation is \*\*\*\* and does not serve as a simple approach to be easy to carry out a judgment.

[0020]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] An immunity chromatography method has sensibility and high singularity, needs to be the combination to which the analysis object and the unique cementing material fitted the sandwich technique in order to give a judgment result efficiently when a sandwich technique was chosen in order to give a judgment result although a special device was not needed for the judgment but actuation was simple, and can be aimed [ no ] at the analysis objects in which a specific binding is possible.

[0021] Moreover, even if it is the combination to which the analysis object and the unique cementing material fitted the sandwich technique, when a superfluous analysis object exists in a specimen, an exact judgment result cannot be obtained according to a prozone phenomenon.

[0022] A judgment result is influenced by the mixed state of the analysis object on chromatography material, and an indicator analysis object although the competing method is applicable to the combination of the analysis object and unique cementing material unsuitable for a sandwich technique. Moreover, when using low-molecular-weight matter, such as hapten, as an analysis object, the difference in the physical property of an analysis object and an indicator analysis object becomes large, the mixed state will be in the condition of an ununiformity, the prozone phenomenon—phenomenon in a sandwich technique arises by this, and the measuring range of an analysis object is narrow.

[0023] Moreover, in the competing method, when using low-molecular-weight matter, such as hapten, as an analysis object, in that case, the analysis object had to be adjusted to the connective with support, such as BSA, etc., the indicator of the connective had to be carried out further, using the chemical modification object of an analysis object as an indicator analysis object in many cases, and adjustment of a reagent has taken time and

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

effort.

[0024] Although it is using low-molecular-weight matter, such as hapten, as the analysis object, since the immunity agglutination inhibition in slide plate superiors needs requiring skill and several steps of reagent addition actuation for the judgment with difficult and exact judging correctly depending on the condition of the obtained aggregate also at an engineer with abundant experience, actuation is \*\*\*\* and it has also required time amount. For this reason, it is not necessarily a simple approach to be easy to carry out a judgment.

[0025] This invention is made in consideration of such a conventional trouble. Also to the combination of the analysis object unsuitable for a sandwich technique, and a unique cementing material, while detection of an analysis object is possible, a prozone phenomenon is avoidable. Also in detection of the estriol which preparation of a reagent can be simplified compared with the immunity chromatography method by the competing method while the judgment result in detection of low-molecular-weight matter, such as hapten, is especially made more to accuracy, for example, is a kind of hapten It is easy to carry out a result judging, and operating instructions aim at offering the detection equipment by the simple \*\*\*\* chromatography.

[0026]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, invention of claim 1 While the specimen application site where a liquefied specimen is applied, the indicator unique cementing material content part containing an indicator unique cementing material, and the detecting element which detects an indicator unique cementing material are formed by the porosity carrier It is arranged in order toward the downstream from the upstream. In said indicator unique cementing material content part Constant-rate content of the labeled unique cementing material which it is movable at least to said detecting element in a damp or wet condition, and is combined with an analysis object is carried out, and it is characterized by fixing the chemical modification object of an analysis object or an analysis object at said detecting element.

[0027] Invention of claim 2 is invention according to claim 1, and is characterized by a part of part of the upstream which can be set at least to said specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element having lapped on [ some ] the part of the downstream.

[0028] Invention of claim 3 is invention according to claim 1 or 2, and at least said specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element are formed in band-like, and it is characterized by being joined on pasteboard.

[0029] Invention of claim 4 is invention according to claim 1 to 3, and said analysis object is hapten and it is characterized by the chemical modification object of said analysis object being a connective of hapten and carrier protein.

[0030] In these invention, if a liquefied specimen is added to a specimen application site, a specimen moves to an indicator unique cementing material content part, while the part containing an indicator unique cementing material will be in a damp or wet condition by the liquefied specimen, the analysis object and indicator unique cementing material in a specimen will be mixed, and the specific binding reaction of an analysis object and an indicator unique cementing material will occur. Of this reaction, the analysis object-indicator unique cementing material complex which is the connective of the analysis object in a specimen and an indicator unique cementing material is formed.

[0031] Only the amount which depended for the amount of this analysis object-indicator unique cementing material complex on the amount of the analysis object in a specimen is formed. Therefore, only the amount which depended on the amount of the analysis object in a specimen also for the amount of the indicator unique cementing material which did not form an analysis object and complex in the indicator unique cementing material content part among the indicator unique cementing materials which were recognizing constant-rate existence exists. Thereby, the mixture of the analysis object-indicator unique cementing material complex depending on the amount of the analysis object in a specimen and an unreacted indicator unique cementing material is formed.

[0032] This mixture moves at least to a detecting element with a chromatography. At least by the detecting element, the chemical modification object of the analysis object fixed by at least the said division or an analysis object and the indicator unique cementing material in a specimen join together. In this case, the amount equivalent to the unreacted indicator unique cementing material depending on the amount of the analysis object in a specimen combines the chemical modification object of the analysis object fixed by at least the detecting element or an analysis object. And by this association, coloring complex arises at least in a detecting element and coloring depending on the amount of the analysis object in a specimen is given. In addition, with the analysis object fixed by at least the detecting element, analysis object-indicator unique synthesis matter complex passes at least a detecting element as it is in order not to react.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[0033] The coloring given at least to a detecting element is obtained in inverse proportion to the amount of the analysis object in a specimen by the above reaction. That is, the unreacted indicator unique cementing material which gives coloring at least to a detecting element decreases, and coloring becomes weak, so that there are many amounts of the analysis object in a specimen.

[0034] In such invention, since the analysis object in a specimen does not react at least by the detecting element and it will not participate in the coloring reaction of an about [ a detecting element ] like the immunity chromatography method by the sandwich technique or the competing method even if an analysis object with an unreacted indicator unique cementing material reaches at least a detecting element, generating of the inaccuracy of the judgment by the lack of coloring by the prozone phenomenon or the prozone phenomenon-phenomenon is lost.

[0035] What is necessary is just to use the antibody to the analysis object acquired by carrying out immunity to animals, such as a mouse, a rat, a rabbit, and a goat, with a conventional method by using an analysis object as an antigen as a unique cementing material used for the above measurement. The antibody to be used cannot be concerned, can be used for a polyclonal antibody and a monoclonal antibody, and it can choose what suits required detection sensitivity and the detection range about the class of an immune animal or antibody.

[0036] Hapten is used as the analysis object in invention of claim 4. Although hapten can be together joined by the antibody in immunochemistry, even if it performs immunity by using as [ the ] as an antigen, it is the matter which cannot guide the immunity function of an animal, and antibody production ability. By preparing the chemical modification object combined with protein support, such as BSA, with the conventional method to this hapten, it can consider as the antigen which can guide antibody production ability, and the antibody to hapten can be obtained by carrying out immunity to animals, such as a mouse which mentioned this above, with a conventional method. However, to use the antibody obtained in this case, it is required to remove completely the antibody combined with protein-support.

[0037] In preparation of an indicator unique cementing material, the antibody obtained by the approach mentioned above can be labeled with a conventional method using radioisotope, the coloring matter, a fluorescent material, the coloring matter, an enzyme, etc. When judging the detection result by comparatively easy viewing, it is desirable to carry out an indicator using the coloring matter. As coloring matter, a metal sol, a color sol, a coloring latex, etc. can be chosen. The indicator of the antibody by these coloring matter can be easily performed with a conventional method. In addition, selection of the coloring matter, the amount of the antibody at the time of an indicator and the labelled antibody of the coloring matter comparatively used for inspection, etc. are chosen from required detection sensitivity and the detection range.

[0038] Especially when it fixes an analysis object at least in the detecting element on a porosity carrier, and it fixes low-molecular-weight matter, such as hapten, it is difficult to fix on a porosity carrier in the condition as it is in many cases, and since reaction effectiveness with a labelled antibody is also bad, it is desirable to use the chemical modification object which combined the analysis object with carrier protein, such as BSA. Since the chemical modification matter which combined the analysis object with carrier protein, such as BSA, is used also when it cannot fix on a porosity carrier, an analysis object is certainly fixable with the analysis object itself, on a porosity carrier with this. Thereby, coloring reaction effectiveness also improves. The amount of immobilization of the analysis object to a porosity carrier top or the chemical modification object of an analysis object is chosen from required detection sensitivity and the detection range.

[0039] In invention of claim 2, a part of part of the upstream which can be set at least to a specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element has lapped on [ some ] the part of the downstream. By this lap, since a specimen can move to the part of the downstream, migration on the porosity carrier by the chromatography can be ensured.

[0040] In invention of claim 3, while at least a specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element are formed in band-like, it is joined on pasteboard. Therefore, fixed rigidity is given at least to a specimen application site, an indicator unique cementing material content part, and a detecting element, and it can bend or can measure smoothly by not deforming.

[0041]

[Embodiment of the Invention] The gestalt of the following operations explains the case where it applies to detection of the estriol in urine.

[0042] Estriol is one of the 3 fractionation of estrogen and estrogen, it is converted and generated from estradiol and generation secretion is carried out in large quantities into blood and urine. When excreted in urine, the form of estriol-16-glucuronide mainly occupies 90% or more.

THIS PAGE BLANK (USP 19)



[0043] It is dehydroepiandrosterone secreted from an embryo suprarenal gland at the time of pregnancy. Since it is generated so much in a placenta by making sulfate into a substrate, measurement of the inside of parent blood or the estriol in urine is indispensable as a functional test of the fetoplacental unit accompanying advance of pregnancy. Moreover, since measurement of the estriol in urine is correlated also with an embryo prognosis, it is useful to serious-illness-izing of a gestosis, and the followup of intrauterine growth retardation. Furthermore, it is effective in precognition of the chronic fetal distress accompanying a delivery post date, i.e., management of an over-term delivery. Moreover, also when incompetent child pregnancy, intrauterine fetal death, a placental sulfatase deficiency, and a placenta aromatase deficiency are suspected, measurement of the estriol in urine serves as an important diagnostic basis. The measured value of measurement in this case shows a low value rather than normal values.

[0044] Drawing 1 and drawing 2 show the detection equipment used for the gestalt of this operation. 4 and the absorption part 5 are arranged at least for the specimen application site 2, the indicator unique cementing material content part 3, and the detecting element in order toward the downstream from the upstream to which a liquefied specimen is applied. It is formed when, as for 4 and the absorption part 5, at least these specimen application sites 2, the indicator unique cementing material content part 3, and a detecting element fabricate a porosity carrier to band-like. As a porosity carrier, porosity plastics, such as polyolefine, the thing of paper material and others, etc. can be used.

[0045] With the detection equipment of the gestalt of this operation, it is arranged so that the part of the upstream may lap on [ some ] the part of the downstream. That is, the downstream edge of the specimen application site 2 has lapped on the upstream edge of the indicator unique cementing material content part 3, and, at least in the detecting element, the downstream edge of the indicator unique cementing material content part 3 has lapped on the upstream edge of 4.

[0046] In the state of such a pile, a specimen can move to the downstream smoothly one by one according to capillarity. For this reason, migration on two or more porosity carriers twisted to a chromatography can be ensured. In addition, the absorption part 5 acts as a sink which absorbs measurement termination liquid, and the upstream edge piles up at least a detecting element on the downstream edge of 4.

[0047] At least the above specimen application site 2, the indicator unique cementing material content part 3, and a detecting element are joined on pasteboard 1, and 4 and the absorption part 5 are being fixed. As pasteboard 1, paper material, such as pasteboard, and a plastic sheet are used, on this pasteboard 1, 4 and the absorption part 5 serve as band-like, and at least the specimen application site 2, the indicator unique cementing material content part 3, and the detecting element are joined. a junction means -- adhesion and joining -- in addition, therefore, it can carry out. Thus, by being joined on pasteboard 1, fixed to 4 and the absorption part 5 rigidity as the specimen application site 2, the indicator unique cementing material content part 3, and a detecting element can be given. Thereby, it can bend or can measure smoothly by not deforming.

[0048] In addition, the detection equipment of the above gestalt is contained in the case which omitted illustration, or a bag body, or where a transparent film, the film in which design processing was carried out by printing are stuck on the topmost part, it is supplied to a commercial scene.

[0049] In the gestalt of this operation, constant-rate content of the labelled antibody [ as opposed to / at least in a detecting element / estriol movable one by one to 4 ] is carried out in the porosity carrier top in the damp or wet condition in the indicator unique cementing material content part 3. The estriol-16-glucuronide (E3-16 G-RSA) which at least the detecting element combined with rabbit serum albumin 4 is fixed as a chemical modification object 6 of an analysis object.

[0050] Gold colloid is used for the indicator from the simplicity of the indicator approach using the anti-estriol rabbit polyclonal antibody obtained by the approach indicated by JP,58-9068,A as an antibody. In addition, as an anti-estriol antibody, the antibody of all the animal species origins, such as a mouse, a rat, a rabbit, and a goat, can be used, and a monoclonal antibody may be used.

[0051] The rabbit-serum-albumin joint estriol-16-glucuronide (E3-16 G-RSA) which is the chemical modification object 6 of the analysis object with which at least the detecting element was fixed by 4 can be obtained by the approach given in JP,58-9068,A. In addition, as a chemical modification object 6 of an analysis object, it is good also considering carrier protein as bovine serum albumin, and if it can certainly fix on a porosity carrier, without destroying an antibody combining site, the class of support will not be asked.

[0052] By \*\*\*\*(ing) a constant rate from a syringe etc. continuously to the porosity carrier which is moving to the one direction with constant speed, immobilization of E3-16 G-RSA which is the chemical modification object 6 of an analysis object is applied in the shape of [ which crosses a band-like porosity carrier ] Rhine, and is

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

performed by drying after that. Thus, since it reacts with band-like [ whole ] compared with the case where it prepares in spot in preparing in the shape of [ which crosses a porosity carrier ] Rhine, the partial leakage in a reaction can be prevented.

[0053] In the detection equipment of a more than, the estriol in urine forms a labelled antibody and complex by the antigen-antibody reaction, and moves in a porosity carrier top. A case is divided and explained about an operation of the gestalt of this operation.

[0054] (1) When the amount of estriol in a specimen is below a constant rate (namely, when there are few amounts of the estriol in a specimen than the amount of the labelled antibody to the estriol which exists in the indicator unique cementing material content part 3). Since the amount of estriol is below a constant rate, the labelled antibody in which all labelled antibodies do not form complex in and do not form complex also moves a porosity carrier top to coincidence with a specimen. And as for the labelled antibody in which estriol and complex were formed, at least in the detecting element by which E3-16 G-RSA is fixed, in 4, at least a detecting element passes 4, without combining with E3-16 G-RSA. On the other hand, the labelled antibody which does not form complex combines with E3-16 G-RSA, and gives coloring of the purplish red color of the shape of Rhine by gold colloid on a porosity carrier.

[0055] Thus, coloring of the purplish red color of the shape of Rhine according [ the amount of estriol in urine ] to gold colloid is accepted on a porosity carrier by \*\*\*\* below a constant rate, and such strong coloring is accepted in it that there are few amounts of estriol.

[0056] (2) When the amount of estriol in a specimen is more than a constant rate (namely, when there are more amounts of the estriol in a specimen than the amount of the labelled antibody to the estriol which exists in the indicator unique cementing material content part 3). Since the amount of estriol in urine is more than a constant rate, almost all labelled antibodies form estriol and complex by the antibody antigen reaction, and move in a porosity carrier top. And the labelled antibody in which estriol and complex were formed moves in a porosity carrier top, without combining at least a detecting element with E3-16 G-RSA fixed by 4. Therefore, when the amount of estriol in urine is more than a constant rate, coloring of the purplish red color of the shape of Rhine by gold colloid is not accepted on a porosity carrier.

[0057] In addition, since there are very few labelled antibodies which combine at least a detecting element with E3-16 G-RSA fixed by 4 even if all labelled antibodies do not form complex completely in this case, coloring of the purplish red color of the shape of Rhine only by the gold colloid which can be judged macroscopically is not formed.

[0058] As mentioned above, with the gestalt of this operation, it becomes [ whether the amount of estriol in urine is below a constant rate or it is more than a constant rate, and ] possible to judge easily macroscopically by the existence of coloring of the purplish red color of the shape of Rhine by gold colloid. And since coloring of the purplish red color of the shape of Rhine by gold colloid is strongly formed so that there are few amounts of estriol, it is possible to perform the quality of the guess which is whenever [ fall / of the amount of estriol in urine ], or the amount of estriol.

[0059] In addition, the cut-off value in the amount of estriol in urine can be set up by adjusting the concentration of the various reagents used for detection equipment between a healthy person's amount of estriol, and the amount of estriol in case the illness accompanied by the fall of the various amounts of estriol is suspected. By that cause, when coloring is obtained, the abnormality fall of the amount of estriol is shown, various kinds of illnesses accompanied by the fall of the amount of estriol will be suspected strongly, coloring will be obtained, so that the coloring is strong, and, as for the inside \*\*\*\* case, the abnormality fall of the amount of estriol will be shown. From this, judgment that there is little possibility that various kinds of illnesses accompanied by the fall of the amount of estriol will be suspected is easy, and can perform detection with simple actuation.

[0060] In addition, in the gestalt of this operation, although the line of a purplish red color was formed by using gold colloid as an indicator, another coloring may be formed by using other indicators, such as a coloring latex. Moreover, it is also possible to obtain the coloring according to the configuration which could fix in other configurations and this fixed, without fixing an antibody in the shape of Rhine.

[0061]

[Effect of the Invention] As mentioned above, with the detection equipment of this invention, when low-molecular-weight matter, such as hapten unsuitable for a sandwich technique, is used as an analysis object, it becomes detectable [ an analysis object ]. Moreover, the prozone phenomenon of seeing by the sandwich technique can be avoided, the result for which preparation of a reagent simplifies rather than the immunity chromatography by the competing method, and also it depends on the amount of an analysis object more at

THIS PAGE BLANK (U8PT9)

accuracy is obtained, and it becomes possible to become easier to carry out a judgment and to perform detection by simple actuation moreover also to the analysis object which is generally detecting by the existence of an aggregate.

---

[Translation done.]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-124771  
(P2001-124771A)

(43) 公開日 平成13年5月11日 (2001.5.11)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 2 1

F I

G 0 1 N 33/543

テマコード\* (参考)

5 2 1

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平11-308028

(22) 出願日 平成11年10月29日 (1999. 10. 29)

(71) 出願人 000135162

株式会社ニッポンジーン

東京都千代田区神田錦町一丁目5番地 金剛錦町ビル

(72) 発明者 米田 祐康

富山県富山市呉羽町5-5

(72) 発明者 糸岡 利行

富山県富山市荒川1-1-25 株式会社ニッポンジーン免疫研究所内

(74) 代理人 100069420

弁理士 奈良 武

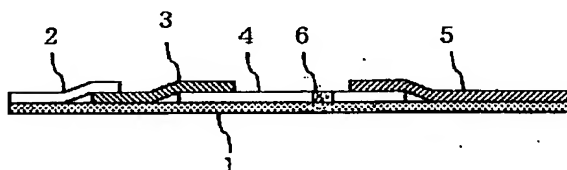
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫クロマトグラフィーによる検出装置

(57) 【要約】

【課題】 免疫クロマトグラフィー法でのサンドイッチ法に適さない分析対象物であっても、その検出を可能とすると共に、正確な判定を可能とする。

【解決手段】 液状の検体が適用される検体適用部位2と、標識特異結合物質を含有した標識特異結合物質含有部位3と、標識特異結合物質を検出する検出部位4とが多孔質キャリアによって形成されると共に、上流側から下流側に向かって順に並べられている。標識特異結合物質含有部位3には、湿潤状態において検出部位4へ移動可能であって、且つ分析対象物と結合する標識化された特異結合物質が一定量含有される。検出部位4には、分析対象物又は分析対象物の化学修飾物6が固定化されている。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 液状の検体が適用される検体適用部位と、標識特異結合物質を含有した標識特異結合物質含有部位と、標識特異結合物質を検出する検出部位とが多孔質キャリアによって形成されると共に、上流側から下流側に向かって順に並べられており、

前記標識特異結合物質含有部位には、湿潤状態において前記検出部位へ移動可能であって、且つ分析対象物と結合する標識化された特異結合物質が一定量含有され、

前記検出部位には、分析対象物又は分析対象物の化学修飾物が固定化されていることを特徴とする免疫クロマトグラフィーによる検出装置。

【請求項 2】 前記検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位における上流側の部位の一部が下流側の部位の一部の上に重なっていることを特徴とする請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィーによる検出装置。

【請求項 3】 前記検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位が帯状に形成され、台紙上に接合されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の免疫クロマトグラフィーによる検出装置。

【請求項 4】 前記分析対象物がハプテンであり、前記分析対象物の化学修飾物がハプテンと担体蛋白質との結合物であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の免疫クロマトグラフィーによる検出装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫クロマトグラフィー法によって分析対象物を検出する検出装置に関する。特に、本発明は、サンドイッチ法が可能な分析対象物と特異結合物質との組合せはもちろん、サンドイッチ法が困難または不可能な分析対象物と特異結合物質との組合せにおいても、分析対象物の検出が可能である検出装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血液、尿等の生体試料中に含まれる微量物質や、環境中に存在する微生物や微量物質の検出には、その感度や特異性の高さから免疫化学的測定法が汎用されている。この測定法の内、免疫化学的測定法にクロマトグラフィーを応用した、いわゆる免疫クロマトグラフィー法は、他の免疫化学的測定法に比べて、操作が簡単であり、検定に要する時間も短く、判定に特殊な機器を必要とせず、熟練を要しないことから、現在多くの場面、例えば病院における臨床検査、研究室等における検定試験、環境検査現場における検定試験、家庭における妊娠反応の検定試験等に広く使用されている。

【0003】最も一般的な免疫クロマトグラフィー法における分析対象物の検出では、分析対象物と、分析対象物に対する種々の標識を付した特異結合物質とをクロマトグラフィー材上で反応させて分析対象物と標識特異結合物質との複合体（例えば、抗原-抗体複合体）を生成

させ、その複合体の標識を種々の手段により検出することが行われている。

【0004】この方法に用いる標識としては、放射性同位元素、発色物質、蛍光物質、着色物質、酵素等があり、検出手投としては、放射線検出器、分光光度計或いは目視によって行われる。検出結果の判定を行うにあたり、標識を検出するための特殊な機器を必要とせず、標識を検出し易くするための抗原抗体反応以外の反応を行う必要もなく、判定にも熟練を要しないことから、着色物質を用いて標識を行い、目視で判定を行うことが汎用されている。着色物質としては、金属ゾル、染料ゾル、着色ラテックス等が使用される。また、検出結果はクロマトグラフィーによって B/F 分離が行われるため、クロマトグラフィー材上での目視がより明確に可能な着色状態となる。

【0005】かかる目視可能な着色を与える方法としては、あらかじめクロマトグラフィー材上に分析対象物に対する特異結合物質を固定化し、分析対象物と標識特異結合物質との複合体と、分析対象物に対する固定化特異結合物質とを反応させることにより、標識特異結合物質と固定化特異結合物質との間に分析対象物を挟み込む形態で検出部位上に複合体が結合する、いわゆるサンドイッチ法が汎用されている。

【0006】サンドイッチ法では、効率良く目視可能な着色を行わせるため、使用する標識特異結合物質と固定化された特異結合物質について、分析対象物に対して異なる結合部位（エピトープ）を有した物質、すなわち 2 種類の特異結合物質を使用することが必要であり、又、分析対象物についても異なるエピトープを有した物質であることが必要となる。

【0007】なお、例外として、分析対象物が同じエピトープを複数与えることが可能な均合は、1 種類の特異結合物質のみでもサンドイッチ法を適用することができるが、この場合は、2 種類の特異結合物質と異なるエピトープを与える分析対象物の組合せを使用する場合に比べ、サンドイッチ法での着色効率が悪い組合せとなっている。しかしながら、選択した特異結合物質及び分析対象物がサンドイッチ法が可能な組合せとしても、分析対象物そのものの形やエピトープの位置によっては立体的な障害が発生し、サンドイッチ法が困難または不可能な場合には、満足できる検出結果が得られない。従って、サンドイッチ法は全ての分析対象物と特異結合物質の組合せに効率良く適用できる方法ではなく、ハプテン等の低分子量物質を分析対象物として検出する場合には不向きとなっている。

【0008】また、サンドイッチ法では分析対象物と標識特異結合物質との複合体を形成する際に過剰の分析対象物が存在する場合、分析対象物と標識特異結合物質との複合体を形成していない遊離の分析対象物の割合が多くなる。このため、サンドイッチ型の複合体の形成率が



低下して、分析対象物が多くあるのに反して、結果として得られる着色が少なくなる現象、いわゆるプロゾーン現象が発生する。

【0009】他の目視可能な着色を与える方法として、特公平7-46107号公報には、競合法による免疫クロマトグラフィーによりエストリオールを検出する方法が記載されている。この競合法による免疫クロマトグラフィー法では、標識特異結合物質に分析対象物そのものや分析対象物の化学修飾物を用いるものであり、サンドイッチ法とは大きく異なるものである。

【0010】競合法による免疫クロマトグラフィーは、分析対象物や分析対象物の化学修飾物が標識されており、クロマトグラフィー材上で検体中の分析対象物と標識分析対象物とが混合状態を形成し、この混合状態でクロマトグラフィー材上で分析対象物に対する特異結合物質があらかじめ固定化してある検出部位までクロマトグラフィーにより移動し、混合物が固定化特異結合物質と競合的に反応して、標識分析対象物と固定化特異結合物質との複合体が目視可能な着色を与える方法である。

【0011】この競合法では、標識分析対象物と固定化特異結合物質との複合体のみで目視可能な着色を与えることから、サンドイッチ法が可能な特異結合物質と分析対象物との組合せの場合はもちろん、1種の特異結合物質と1つのエпитープしか与えることができない分析対象物との組合せでも使用可能な方法であり、従って、ハプテン等の低分子量物質を分析対象物とした場合にも使用することが可能となっている。

【0012】ハプテン等の低分子量物質を分析対象物とする場合、標識分析対象物には分析対象物の化学修飾物が多く使用されている。これはハプテン等の低分子量物質を直接標識することが困難な場合があることや、標識特異結合物質と固定化特異結合物質の反応効率を上昇させるためである。分析対象物の化学修飾法としては、BSA（ウシ血清アルブミン）等のタンパク質担体に複数の分析対象物を結合させる方法が汎用されている。

【0013】特公平7-46107号公報には、エストリオールとBSAの結合物を調製し、その結合物に染料ゾルの標識を行う方法、そしてそれらを使用した競合法による免疫クロマトグラフィー法が記載されている。この競合法による免疫クロマトグラフィー法では、検体中の反応対象物の量そのものではなく、分析対象物と標識分析対象物の混合比に依存して判定結果が与えられる。従って、安定な測定結果を得るには、分析対象物と標識分析対象物とがクロマトグラフィー材上で均一な混合状態を形成していることが必要であり、クロマトグラフィー材上で部分的に不均一な混合状態を形成している場合や、測定毎に混合状態に違いが生じる場合には、安定な測定結果が得られない。さらに、検体中の分析対象物がハプテン等の低分子量物質の場合、分析対象物と標識分析対象物との物理的性質の違いが大きくなり、それによ

てクロマトグラフィー材上を移動する速度に差が生じて、均一な混合状態は得られ難くなる。

【0014】また、検体中にハプテン等の低分子物質である分析対象物が多く存在すればするほど、クロマトグラフィー材上の移動速度の差により、分析対象物と標識分析対象物の混合液の展開液の先端側で分析対象物過多の傾向が大きくなる。これにより、均一な混合状態を形成している場合に比べ、あらかじめ多くの分析対象物が固定化特異結合物質と結合することによる着色の減少が起こる状態、すなわちサンドイッチ法におけるプロゾーン現象的な状態が発生し、分析対象物の測定範囲が狭くなる。

【0015】以上のことから、ハプテン等の低分子量物質の検出においては、免疫クロマトグラフィー法を採用するには至っていない。例えば、検体を尿としたエストリオールの検出には、免疫クロマトグラフィーではなく、スライド板上等での免疫凝集阻止反応が用いられている。

【0016】尿中のエストリオールの免疫凝集阻止反応では、少なくとも2種の試薬が必要となっている。試薬1としては、標識された抗エストリオール抗体が液体中に分散している試薬である。標識としては、金コロイド、ラテックス、赤血球等が使用され、これらの標識と抗体とを結合させることは常法により行われる。試薬2としては、エストリオールが複数結合した担体が液体中に分散している試薬であり、担体としては、試薬1と同様でも良く、例えばBSA等の蛋白分子でも良い。後者のエストリオールのBSAへの結合は、各種文献に記載されている方法により行うことが可能である。

【0017】尿中のエストリオールの免疫凝集阻止反応では、まず試薬1と検体とを混合して十分に反応させ、次に試薬2を添加して反応させる。この時、検体中に一定量以上のエストリオールが存在する場合は、試薬1と尿中のエストリオールが結合していることにより、試薬1と試薬2の抗原抗体反応が阻害され、試薬1と試薬2は抗原抗体反応による凝集塊を生成しない。一方、検体中のエストリオールが一定量以下の場合は、試薬1と尿中のエストリオールの結合が少ないため、試薬1と試薬2の抗原抗体反応が阻害されないため、試薬1と試薬2の抗原抗体反応による凝集塊が生成する。

【0018】スライド板上での免疫凝集阻止反応は、このように試薬1と検体との反応を行い、次ぎに試薬2との反応を行うことによって、検体中のエストリオールが試薬1と試薬2の凝集反応を阻害することを利用し、生じる凝集塊の有無または凝集塊の状態によってエストリオールの検出を行うものである。この場合、検体中のエストリオールを半定量する場合は、検体を数種の倍率に希釈し、それぞれの希釈した検体について同様の検査を行い、検体の希釈倍率と凝集塊の有無によって検体中のエストリオールを半定量することができる。

10

20

30

40

50

【0019】しかしながら、このような凝集塊の有無または凝集塊の状態による測定結果の日視判定では、得られた凝集塊の状態により、経験豊富な技師でも正確に判定するのが困難であり、正確な判定には熟練を要している。また、半定量のための検体の希釈や数段階の試薬添加操作が必要なため、操作が煩雑であり、判定のし易い簡便な方法とはなっていない。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】免疫クロマトグラフィー法は、感度や特異性が高く、判定に特殊な機器を必要とせず、操作が簡便であるが、判定結果を与えるためにサンドイッチ法を選択した場合、効率良く判定結果を与えるためには分析対象物と特異結合物質とがサンドイッチ法に適した組合せであることが必要であり、特異的結合が可能なすべての分析対象物を対象とすることはできないものである。

【0021】また、分析対象物と特異結合物質がサンドイッチ法に適した組合せであったとしても、検体中に過剰の分析対象物が存在する場合には、ブロゾーン現象により正確な判定結果を得ることができない。

【0022】競合法は、サンドイッチ法に適さない分析対象物と特異結合物質との組合せに適用可能であるが、クロマトグラフィー材上での分析対象物と標識分析対象物との混合状態によって判定結果が左右される。また、ハブテン等の低分子量物質を分析対象物とする場合は、分析対象物と標識分析対象物の物理的性質の違いが大きくなって、混合状態が不均一の状態となり、これによりサンドイッチ法でのブロゾーン現象的な現象が生じ、分析対象物の測定範囲が狭くなっている。

【0023】また、競合法において、ハブテン等の低分子量物質を分析対象物とする場合は、標識分析対象物として分析対象物の化学修飾物を用いることが多く、その場合は、分析対象物をBSA等の担体等との結合物に調整し、さらにその結合物を標識しなければならず、試薬の調整に手間を要している。

【0024】スライド板上等での免疫凝集阻止反応は、ハブテン等の低分子量物質を分析対象物としているが、得られた凝集塊の状態によっては、経験豊富な技師でも正確に判定するのが困難であり、正確な判定には熟練を要すること、数段階の試薬添加操作が必要であるため操作が煩雑で時間もかかっている。このため、必ずしも判定のし易い簡便な方法とはなっていない。

【0025】本発明は、このような従来の問題点を考慮してなされたものであり、サンドイッチ法に適さない分析対象物と特異結合物質の組合せに対しても分析対象物の検出が可能であると共にブロゾーン現象を回避でき、競合法による免疫クロマトグラフィー法に比べ、特にハブテン等の低分子量物質の検出における判定結果をより正確にできると共に試薬の調製を簡素化でき、例えば、ハブテンの一種であるエストリオールの検出において

も、結果判定がし易く、操作方法が簡便である免疫クロマトグラフィーによる検出装置を提供することを目的とする。

【0026】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、請求項1の発明は、液状の検体が適用される検体適用部位と、標識特異結合物質を含有した標識特異結合物質含有部位と、標識特異結合物質を検出する検出部位とが多孔質キャリアによって形成されると共に、上流側から下流側に向かって順に並べられており、前記標識特異結合物質含有部位には、湿潤状態において前記検出部位へ移動可能であって、且つ分析対象物と結合する標識化された特異結合物質が一定量含有され、前記検出部位には、分析対象物又は分析対象物の化学修飾物が固定化されていることを特徴とする。

【0027】請求項2の発明は、請求項1記載の発明であって、前記検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位における上流側の部位の一部が下流側の部位の一部の上に重なっていることを特徴とする。

【0028】請求項3の発明は、請求項1又は2記載の発明であって、前記検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位が帯状に形成され、台紙上に接合されていることを特徴とする。

【0029】請求項4の発明は、請求項1～3のいずれかに記載の発明であって、前記分析対象物がハブテンであり、前記分析対象物の化学修飾物がハブテンと担体蛋白質との結合物であることを特徴とする。

【0030】これらの発明において、検体適用部位に液状の検体を添加すると、検体が標識特異結合物質含有部位へ移動し、標識特異結合物質を含有した部位が液状の検体によって湿潤状態になると同時に、検体中の分析対象物と標識特異結合物質とが混合されて、分析対象物と標識特異結合物質との特異的結合反応が起きる。この反応により、検体中の分析対象物と標識特異結合物質との結合物である分析対象物-標識特異結合物質複合体が形成される。

【0031】この分析対象物-標識特異結合物質複合体の量は、検体中の分析対象物の量に依存した量だけが形成される。従って、標識特異結合物質含有部位に一定量存在していた標識特異結合物質のうち、分析対象物と複合体を形成しなかった標識特異結合物質の量も検体中の分析対象物の量に依存した量だけ存在する。これにより、検体中の分析対象物の量に依存した分析対象物-標識特異結合物質複合体と未反応の標識特異結合物質との混合物が形成される。

【0032】かかる混合物は、クロマトグラフィーによって検出部位へ移動する。検出部位では、同部位に固定化されている分析対象物又は分析対象物の化学修飾物と、検体中の標識特異結合物質とが結合する。この場合、検出部位に固定化されている分析対象物又は分析対

象物の化学修飾物は、検体中の分析対象物の量に依存した未反応の標識特異結合物質に相当する量が結合する。そして、この結合により、着色複合体が検出部位に生じ、検体中の分析対象物の量に依存した着色を与える。なお、分析対象物-標識特異結合物質複合体は、検出部位に固定化されている分析対象物とは反応しないため、検出部位をそのまま通過する。

【0033】以上の反応によって検出部位に与えられる着色は、検体中の分析対象物の量に反比例して得られる。すなわち、検体中の分析対象物の量が多いほど、検出部位に着色を与える未反応の標識特異結合物質が少なくなり、着色が弱くなる。

【0034】このような発明では、検体中の分析対象物が検出部位では反応しないので、たとえ標識特異結合物質とは未反応の分析対象物が検出部位に達したとしても、サンドイッチ法や競合法による免疫クロマトグラフィー法のように検出部位での着色反応に関与しないことから、プロゾン現象やプロゾン現象的な現象による着色不足による判定の不正確さは発生することがなくなる。

【0035】以上の測定に使用する特異結合物質としては、分析対象物を抗原として、常法によりマウス、ラット、ウサギ、ヤギ等の動物に免疫することにより得られる分析対象物に対する抗体を用いればよい。使用する抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体に関わらず使用することができ、免疫動物や抗体の種類については、必要な検出感度、検出範囲に適合するものを選択することができる。

【0036】請求項4の発明では、ハプテンを分析対象物としている。ハプテンとは、抗体が免疫化学的に結合することが可能であるが、そのままを抗原として免疫を行っても、動物の免疫機能、抗体産生能を誘導できない物質である。このハプテンに対しては、常法によってBSA等の蛋白質担体と結合させた化学修飾物を調製することによって、抗体産生能を誘導できる抗原とすることができ、これを上述したマウスなどのような動物に常法によって免疫することで、ハプテンに対する抗体を得ることができる。ただし、この場合に得られる抗体を使用する場合は、蛋白質担体に結合する抗体を完全に取り除いておくことが必要である。

【0037】標識特異結合物質の調製には、上述した方法で得られた抗体を、放射性同位元素、発色物質、蛍光物質、着色物質、酵素等を用いて常法によって標識化することができる。比較的簡単な目視による検出結果の判定を行う場合には、着色物質を用いて標識することが好ましい。着色物質としては、金属ゾル、染料ゾル、着色ラテックス等を選択することができる。これらの着色物質による抗体の標識は、常法によって簡単に行うことができる。なお、着色物質の選択や、標識時の抗体と着色物質の割合、検査に用いる標識抗体の量などは、必要な

検出感度と検出範囲から選択されるものである。

【0038】多孔質キャリア上の検出部位に分析対象物を固定化する場合、特にハプテン等の低分子量物質を固定化する場合、そのままの状態では多孔質キャリア上に固定化することが困難な場合が多く、標識抗体との反応効率も悪いことから、分析対象物をBSA等の担体蛋白質と結合させた化学修飾物を用いることが望ましい。これによって、分析対象物そのものでは多孔質キャリア上に固定することができない場合にも、分析対象物をBSA等の担体蛋白質と結合させた化学修飾物質を用いるため、多孔質キャリア上に確実に分析対象物を固定化することができる。これにより、着色反応効率も向上する。多孔質キャリア上への分析対象物又は分析対象物の化学修飾物の固定化の量は、必要な検出感度と検出範囲から選択するものである。

【0039】請求項2の発明では、検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位における上流側の部位の一部が下流側の部位の一部の上に重なっている。この重なりによって、検体が下流側の部位に移動することができるため、クロマトグラフィーによる多孔質キャリア上の移動を確実に行うことができる。

【0040】請求項3の発明では、検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位が帯状に形成されると共に、台紙上に接合されている。従って、検体適用部位、標識特異結合物質含有部位及び検出部位に一定の剛性が付与され、撓んだり、変形することがなく、測定を円滑に行うことができる。

【0041】

【発明の実施の形態】以下の実施の形態では、尿中のエストリオールの検出に適用した場合を説明する。

【0042】エストリオールは卵胞ホルモン、エストロゲンの3分画の一つであり、エストラジオールより転換されて生成され、血中、尿中に大量に生成分泌される。尿中に排泄されるときには、主としてエストリオール-16-グルクロナイドの形が90%以上を占める。

【0043】妊娠時は胎児副腎より分泌されるdehydroepiandrosterone sulfateを基質として、胎盤において多量に生成されるため、母体血中あるいは尿中エストリオールの測定は妊娠の進行に伴う胎児胎盤系の機能検査として不可欠となっている。また、尿中エストリオールの測定は胎児予後とも相關するので、妊娠中毒症の重症化、子宮内胎児発育遅延の経過観察に役立つ。さらに、分娩予定日超過に伴う潜在胎児仮死の予知すなわち過期産の管理にも有効となっている。又、無能児妊娠、子宮内胎児死亡、胎盤スルファターゼ欠損症、胎盤アロマトーゼ欠損症が疑われる場合も、尿中エストリオールの測定は重要な診断根拠となる。この場合の測定の測定値は正常値よりも低値を示す。

【0044】図1及び図2は、この実施の形態に使用さ

れる検出装置を示す。液状の検体が適用される上流側から下流側に向かって検体適用部位2、標識特異結合物質含有部位3、検出部位4及び吸収部位5が順に並べられている。これらの検体適用部位2、標識特異結合物質含有部位3、検出部位4及び吸収部位5は、多孔質キャリアを帯状に成形することにより形成されている。多孔質キャリアとしては、ポリオレフィンなどの多孔質プラスチックや紙材、その他のものなどを使用することができる。

【0045】この実施の形態の検出装置では、上流側の部位が下流側の部位の一部の上に重なるように並べられている。すなわち、検体適用部位2の下流側端部が標識特異結合物質含有部位3の上流側端部の上に重なっており、標識特異結合物質含有部位3の下流側端部が検出部位4の上流側端部の上に重なっている。

【0046】このような重ね状態では、毛管現象によって検体が下流側に順次、円滑に移動することができる。このため、クロマトグラフィーによる複数の多孔質キャリア上の移動を確実に行うことができる。なお、吸収部位5は測定終了液を吸収するシンクとして作用するものであり、その上流側端部は検出部位4の下流側端部の上に重ねられるものである。

【0047】以上の検体適用部位2、標識特異結合物質含有部位3、検出部位4及び吸収部位5は台紙1上に接合されて固定されている。台紙1としては、厚紙などの紙材、プラスチック板が使用され、この台紙1上に検体適用部位2、標識特異結合物質含有部位3、検出部位4及び吸収部位5が帯状となって接合されている。接合手段は、接着、溶着、その他によって行うことができる。このように台紙1上に接合されることにより、検体適用部位2、標識特異結合物質含有部位3、検出部位4及び吸収部位5に一定の剛性を付与することができる。これにより、撓んだり、変形することがなく、測定を円滑に行うことができる。

【0048】なお、以上の形態の検出装置は、図示を省略したケースや袋体内に収納されて、或いは透明なフィルムや、印刷によってデザイン処理されたフィルム等を最上部に貼り付けた状態で市場に供給されるものである。

【0049】この実施の形態において、標識特異結合物質含有部位3には、湿潤状態において多孔質キャリア上を検出部位4へと順次移動可能なエストリオールに対する標識抗体が一定量含有されている。検出部位4には、ウサギ血清アルブミンと結合したエストリオール-16-グルクロナイド(E3-16G-RSA)が、分析対象物の化学修飾物6として固定化されている。

【0050】抗体としては、特開昭58-9068号公報に記載されている方法によって得られた抗エストリオールウサギポリクローナル抗体を用い、標識には、標識方法の簡便さから金コロイドを用いている。なお、抗エ

ストリオール抗体としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ等のあらゆる動物種由来の抗体を用いることができ、モノクローナル抗体を用いても良い。

【0051】検出部位4に固定化された分析対象物の化学修飾物6であるウサギ血清アルブミン結合エストリオール-16-グルクロナイド(E3-16G-RSA)は、特開昭58-9068号公報記載の方法で得ることができる。なお、分析対象物の化学修飾物6としては、担体蛋白質をウシ血清アルブミンとしても良く、抗体結合部位を破壊することなく多孔質キャリア上に確実に固定化することができるものであれば、担体の種類は問わない。

【0052】分析対象物の化学修飾物6であるE3-16G-RSAの固定化は、一定速度で一方向に移動している多孔質キャリアに対して、注射器等から一定量を連続的に塗出することにより、帯状の多孔質キャリアを横切るライン状に塗布し、その後、乾燥することにより行う。このように多孔質キャリアを横切るライン状に設ける場合には、スポット的に設ける場合に比べて帯状の全体で反応するため、部分的な反応漏れを防止することができる。

【0053】以上の検出装置において、尿中のエストリオールは、抗原抗体反応により標識抗体と複合体を形成し、多孔質キャリア上を移動する。この実施の形態の作用について場合を分けて説明する。

【0054】(1) 検体中のエストリオール量が一定量以下の場合(すなわち、標識特異結合物質含有部位3に存在するエストリオールに対する標識抗体の量よりも検体中のエストリオールの量が少ない場合)。エストリオール量が一定量以下のため、標識抗体が全て複合体を形成するわけではなく、複合体を形成していない標識抗体も検体と共に同時に多孔質キャリア上を移動する。そして、E3-16G-RSAが固定化されている検出部位4では、エストリオールと複合体を形成した標識抗体はE3-16G-RSAと結合することなく検出部位4を通過する。これに対し、複合体を形成していない標識抗体がE3-16G-RSAと結合し、多孔質キャリア上に金コロイドによるライン状の赤紫色の着色を与える。

【0055】このように、尿中のエストリオール量が一定量以下の項には、多孔質キャリア上に金コロイドによるライン状の赤紫色の着色が認められ、またエストリオール量が少ないほど強い着色が認められる。

【0056】(2) 検体中のエストリオール量が一定量以上である場合(すなわち、標識特異結合物質含有部位3に存在するエストリオールに対する標識抗体の量よりも検体中のエストリオールの量が多い場合)。尿中のエストリオール量が一定量以上であるため、ほとんどの標識抗体が抗体抗原反応によりエストリオールと複合体を形成し、多孔質キャリア上を移動する。そして、エストリオールと複合体を形成した標識抗体は、検出部位4に

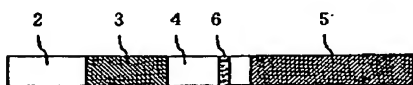
固定化されているE3-16G-RSAと結合することなく多孔質キャリア上を移動する。従って、尿中のエストリオール量が一定量以上の場合には、多孔質キャリア上に金コロイドによるライン状の赤紫色の着色は認められない。

【0057】なお、この場合、完全に全ての標識抗体が複合体を形成していなくても、検出部位4に固定化されているE3-16G-RSAに結合する標識抗体が非常に少ないため、肉眼的に判定できるだけの金コロイドによるライン状の赤紫色の着色は形成されることがない。

【0058】以上のように、この実施の形態では、尿中のエストリオール量が一定量以下であるか、一定量以上であるかを、金コロイドによるライン状の赤紫色の着色の有無によって肉眼的に容易に判定することが可能となる。しかも、エストリオール量が少ないほど金コロイドによるライン状の赤紫色の着色が強く形成されるため、尿中のエストリオール量の低下度の推測、またはエストリオール量の定性を行うことが可能となっている。

【0059】加えて、検出装置に使用する各種試薬の濃度を調整することにより、尿中のエストリオール量におけるカットオフ値を、健常者のエストリオール量と、各種エストリオール量の低下を伴う疾病が疑われる場合のエストリオール量との間に設定することができる。それにより、着色が得られた場合には、エストリオール量の異常低下が示されており、その着色が強いほど、エストリオール量の低下を伴う各種の疾病が強く疑われ、着色が得られなかった場合は、エストリオール量の異常低下が示されていないことになる。このことから、エストリオール量の低下を伴う各種の疾病が疑われる可能性が少\*

【図1】



\*ないというような、判定が容易で、操作が簡便な検出を行うことができる。

【0060】なお、この実施の形態においては、標識として金コロイドを用いることにより赤紫色の線が形成されたが、着色ラテックスなど他の標識を用いることにより別の着色を形成しても良い。又、抗体をライン状に固定化することなく、他の形状に固定化しても良く、これにより固定化した形状に応じた着色を得ることも可能である。

10 【0061】

【発明の効果】以上のように本発明の検出装置では、サンドイッチ法には適さないハプテン等の低分子量物質を分析対象物とした場合においても、分析対象物の検出が可能となる。又、サンドイッチ法でみられるブロゾーン現象が回避でき、競合法による免疫クロマトグラフィーよりも試薬の調製が簡素化するうえに、より正確に分析対象物の量に依存する結果が得られ、一般的に凝集塊の有無によって検出を行っている分析対象物に対しても、より判定がし易くなり、しかも簡便な操作での検出を行うことが可能となる。

20 【図面の簡単な説明】

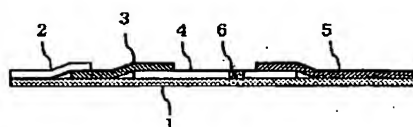
【図1】本発明の実施の形態における検出装置の平面図である。

【図2】検出装置の側面図である、

【符号の説明】

- 1 台紙
- 2 検体適用部位
- 3 標識特異結合物質含有部位
- 4 検出部位

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 大上 光明  
富山県富山市荒川1-1-25 株式会社ニッポンジーン免疫研究所内

(72)発明者 中川 かおる  
富山県富山市荒川1-1-25 株式会社ニッポンジーン免疫研究所内

THIS PAGE BLANK (USPTO)